© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Parasitologie und Molekularbiologie

Julia WALOCHNIK & Horst ASPÖCK

Denisia **6**, zugleich Kataloge
des OÖ. Landesmuseums,
Neue Folge Nr. **184** (2002), 97-113

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Abstract:

Parasitology and molecular biology

The tools of molecular biology are becoming increasingly relevant to parasitology. The sequencing of complete genomes of several protozoa and helminths is allowing great advances in the study of the biology of parasites and in improving diagnostics, treatment, and prophylaxis of many parasitic infections.

In parasitology, molecular biological methods have their major applications in epidemiological and phylogenetical studies. In morphologically indistinguishable species with different pathogenicity, however, these methods are also of great value for differential diagnostics. Unique DNA sequences provide very high levels of specificity, and PCR allows extremely high levels of sensitivity. New techniques, such as DNA microarrays will make rapid screening tests possible and the ability to use genome data will increase the options for parasite control. However, most of these methods are technically demanding and rather expensive and are therefore not always applicable, particularly not in countries where the most important parasitic infections are endemic.

Key words: Molecular biology, DNA, PCR, sequencing, diagnostics, phylogeny.

1 Einleitung

Die Molekularbiologie ist jener Wissenschaftszweig der Biologie, der sich mit den Strukturen und Funktionen von Molekülen befasst – das Schlüsselmolekül der Molekularbiologie ist die DNA[1]. Die Molekularbiologie etablierte sich zwischen 1930-1960 als ein eigenes Fach und hat dann im letzten Drittel des 20. Jahrhunderts einen ungeahnten Aufstieg erfahren. Molekularbiologische Techniken sind heute auch in der Parasitologie weit verbreitet.

In den letzten Jahren sind die Erforschung bestimmter Gene und die Sequenzierung ganzer Genome zahlreicher Parasiten weit fortgeschritten, wodurch sich vollkommen neue Möglichkeiten in der Untersuchung der Biologie, der Diagnostik und der Kontrolle dieser Parasiten eröffnen. Vor allem auch in der Epidemiologie, in der Entwicklung neuer antiparasitärer Wirkstoffe und nicht zuletzt in der Entwicklung von Impfstoffen ergeben sich durch die Anwendung molekularbiologischer Techniken neue Perspektiven (GUTIERREZ 2000; SIBLEY & HALDAR 1999). Bis heute gibt es keine wirklich wirksame und in größerem Maßstab anwendbare Vakzine gegen irgendeine parasitäre Erkrankung, und die signifikanten Durchbrüche in der Entdeckung neuer antiparasitärer Wirkstoffe haben sich in den letzten 40 Jahren auf weniger als eine Handvoll beschränkt. Dem gegenüber steht eine stetig zunehmende Resistenz zahlreicher Erreger gegen die gängigen Wirkstoffe und eine durch die wachsende Weltbevölkerung steigende Zahl von Menschen mit Parasitosen. Auch in Mitteleuropa haben verschiedene Parasitosen nicht zuletzt durch die stark zunehmende Reisetätigkeit der Bevölkerung der letzten Jahrzehnte wieder an Bedeutung gewonnen.

Die PCR, die wohl wichtigste Erfindung in der Molekularbiologie, hat die gesamte Diagnostik geradezu revolutioniert und ist auch in der Diagnostik mancher Parasitosen von unschätzbarem Wert. Durch den Einsatz der PCR kann eine so hohe Sensitivität erreicht werden, dass theoretisch das Vorhandensein einer einzelnen Erreger-Zelle nachgewiesen werden kann. Weiters kann durch Kombination mit Techniken wie RFLP, RAPD oder dem Sequenzieren die Spezifität bis hin zur Stammdifferenzierung gesteigert werden.

Insgesamt scheint durch ein Verständnis der Molekularbiologie der Wirt-Parasit-Wechselwirkungen und durch Anwendung von Methoden aus den neuen Wissenschaftsdisziplinen „Genomik", „Proteomik" und Bioinformatik, die Aussicht auf eine gezielte Prävention und Kontrolle von parasitären Erkrankungen um vieles näher gerückt (BARRETT et al. 2000; TARLETON & KISSINGER 2001).

2 Meilensteine der Molekularbiologie

Zwar ist die moderne Molekularbiologie einer der jüngsten Wissenschaftszweige der Naturwissenschaften, ihre Geschichte beginnt jedoch bereits Mitte des 19. Jahrhunderts, als der Augustinerpater Gregor MENDEL (1822-1884) im Klostergarten von Altbrünn seine Kreuzungsversuche mit der Gartenerbse *Pisum sativum* durchführte. Aber, obwohl er die Ergebnisse seiner Forschungsexperimente im Jahre 1865 in den „Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn" veröffentlichte und diese Zeitschrift in 120 Universitätsbibliotheken gelangte und MENDEL selbst noch zahlreiche Sonderdrucke versandte, realisierte damals niemand, dass mit seinem Postulat über die Existenz von diskreten Vererbungseinheiten (heute Gene) der erste große Schritt in der Aufklärung der Verer-

[1] Internationalen Gepflogenheiten entsprechend verwenden wir in diesem Kapitel nicht die deutsche Abkürzung DNS (Desoxyribonukleinsäure), sondern die englische Abkürzung DNA (deoxy ribonucleic acid).

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Kasten 1:

WATSON und CRICK entschlüsseln die DNA



Zwar war die DNA schon 1868 entdeckt worden, die Mechanismen, durch die genetische Information von einer Generation zur nächsten weitergegeben wird, waren jedoch vollkommen unklar, bis Rosalind FRANKLIN (1920-1958) 1952 den Beweis für die Anzahl der DNA-Stränge liefern und den Abstand der Helix und die Symmetrie der Einheiten zeigen konnte. Und schon im darauffolgenden Jahr, 1953, gelang dann James WATSON, einem amerikanischer Genetiker, und Francis CRICK, einem englischen Physiker, der Nachweis der Doppelhelix-Struktur für die DNA. Dies sollte der Beginn einer ungeahnten Entwicklung der Molekularbiologie und Biotechnologie sein. WATSON und CRICK veröffentlichten ihre Forschungsergebnisse am 25. April 1953 in *Nature* (WATSON & CRICK 1953) und erhielten gemeinsam mit WILKINS für diese bahnbrechende Arbeit 1962 den Nobelpreis. FRANKLIN starb 1958, im Alter von nur 37 Jahren, an Krebs. Da der Nobelpreis nicht posthum vergeben wird, konnte sie vom Komitee nicht berücksichtigt werden, jedoch wurde immer wieder betont, dass ihre Arbeiten den Grundstein für die Entschlüsselung der DNA gelegt hatten.

bung von Eigenschaften getan war, und somit der Grundstein eines neuen Wissenschaftszweiges, der Genetik, gelegt worden war. Auch die Entdeckung der DNA 1868 durch Friedrich MIESCHER (1844-1895) blieb lange Zeit wenig beachtet. MIESCHER, ein Schweizer Biologe, führte Versuche über die Chemie des Zellkerns durch und entdeckte dabei eine Phosphor-enthaltende Substanz, welche er Nuklein nannte. Er wies nach, dass sich Nuklein aus einem Säureteil, welcher uns heute als DNA bekannt ist, und einem basischen Proteinteil, der heute als Histon bezeichnet wird, zusammensetzt.

Erst mit Beginn des 20. Jahrhunderts, als man anfing, ausgehend von der prozessorientierten Biochemie sich unter Zuhilfenahme grundlegender physikalischer Prinzipien auf die basalen biologischen Strukturen und deren Funktionen zu fokussieren, erkannte man die Tragweite von MENDELS Experimenten. 1927 konnte dann erstmals gezeigt werden, dass genetische Schäden vererbbar sind. Ein Jahr später, im Jahre 1928, entdeckte Frederick GRIFFITH zufällig und vollkommen unbeabsichtigt den Vorgang der Transformation. Er hatte Mäuse mit einer Mischung aus lebenden avirulenten *Streptococcus pneumoniae* Typ I und hitzeabgetöteten virulenten *S. pneumoniae* Typ II infiziert und beobachtet, dass dies zum Tod der Mäuse führte. Er folgerte daraus, dass die genetische Information irgendwie von den toten virulenten Bakterien auf die lebenden ursprünglich avirulenten übergegangen sein musste. 1944 konnten dann Oswald AVERY, Colin MACLEOD und Maclyn MCCARTY zeigen, dass die DNA für die Transformation eines avirulenten *S. pneumoniae* Stammes in einen virulenten verantwortlich ist, indem sie die DNA eines virulenten Stammes in einen nicht virulenten Stamm von *S. pneumoniae* überimpften.

Die wohl wichtigsten Entdeckungen der Molekularbiologie wurden in den 50er Jahren des 20sten Jahrhunderts gemacht. 1950 wies Barbara MCCLINTOCK die mobilen genetischen Elemente (Transposons) im Mais nach und im selben Jahr klärte Erwin CHARGAFF (1905-2002), ein US-Biologe, die Zusammensetzung der Nukleinsäuremoleküle aus Purin- und Pyrimidinbasen, nämlich aus Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin auf. Diese vier chemischen Basen sind durch ihre Anordnung (Sequenz) für die Speicherung der Erbinformationen verantwortlich. CHARGAFF postulierte außerdem die Mengengleichheit der Basen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin – und damit die Basenpaarung (CHARGAFFsche Regel). Alfred HERSHEY und Martha CHASE konnten 1952 demonstrieren, dass, wenn ein Virus eine Bakterienzelle infiziert, es die DNA des Virus und nicht seine Protein-Hülle ist, die in die Wirtszelle gelangt und die genetische Information für die Replikation des Virus trägt und im Jahre 1953 schließlich wurde von WATSON und CRICK die Struktur der DNA entschlüsselt (siehe Kasten 1). 1957 wurde von Arthur KORNBERG und Severo OCHOA die DNA-Polymerase entdeckt und 1959 konnten SAWADA und Kollegen zeigen, dass die Antibiotika-Resistenz zwischen *Shigella*-Stämmen und *Escherichia coli* durch extrachromosomale Plasmide ausgetauscht werden kann und dass für diesen Vorgang weder Transformation noch Transduktion notwendig sind.

Gene kodieren Proteine. Bereits 1941 wurde das „Ein Gen – ein Protein"-Postulat erbracht, und zwar von George BEADLE und Edward TATUM, welche an dem Pilz *Neurospora crassa* arbeiteten. Im Jahr 1961 wiesen CRICK und Sidney BRENNER die Existenz einer transfer-RNA, welche einen 3 Basen Code benutzt und direkt an der Synthese von Proteinen beteiligt ist, nach und Marshall NIRENBERG und Heinrich MATTHAEI konnten zeigen, dass das Polynukleotid Poly-U zu der Synthese eines Polypeptids führt, welches nur aus der Aminosäure Phenylalanin

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

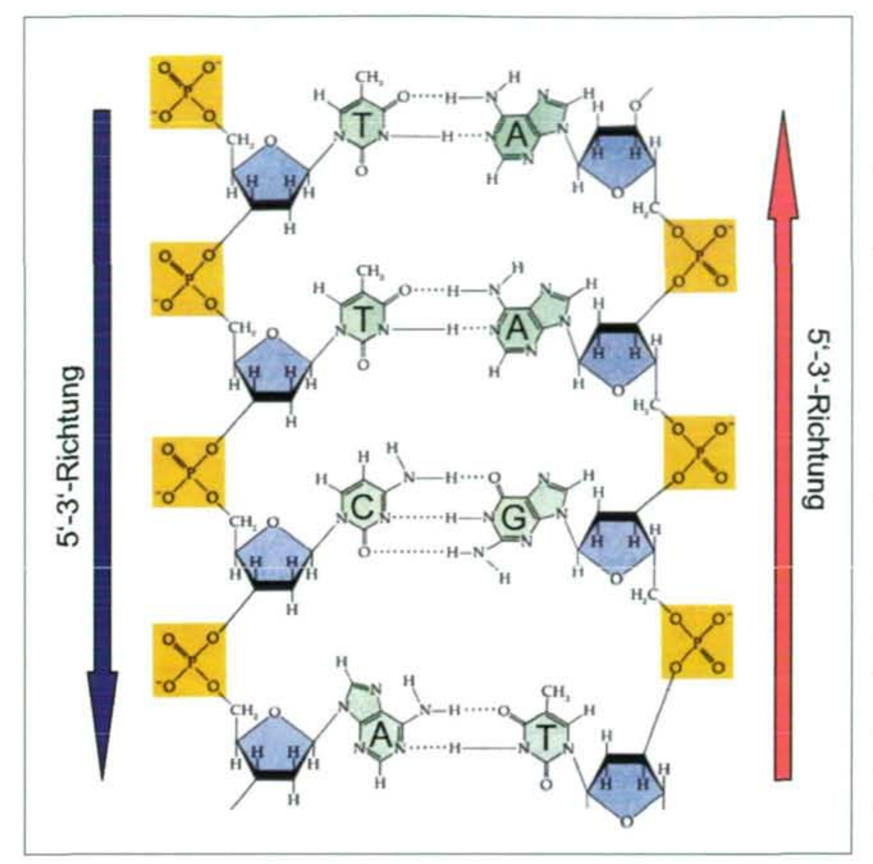


Abb. 1: Struktur der DNA. Die DNA ist eine Desoxyribonukleinsäure. Ein Nukleotid setzt sich aus einem Zucker (Desoxyribose), einem Phosphatrest und einer der vier Basen (den Purinen A und G und den Pyrimidinen T und C) zusammen. Die einzelnen Nukleotide lagern sich zu einem Polynukleotid zusammen, indem jeder Zucker mit dem Phosphatrest des nächsten Nukleotids eine kovalente Bindung eingeht. Jede Base hingegen, verbindet sich über Wasserstoffbrücken mit der komplementären Base des gegenüberliegenden Stranges, wobei sich immer A mit T und G mit C paart.

(Modifiziert nach http://oak.cats.ohiou.edu/~ballardh)

besteht – das Triplett UUU musste also Phenylalanin kodieren. 1966 schließlich klärten NIRENBERG, OCHOA und Gobind KHORANA den genetischen Code auf.

1972 wurde zum ersten Mal ein Restriktionsenzym, ein Protein, das einen DNA-Faden biologisch aufschneiden kann, aus einem Bakterium isoliert. Ein weiteres Enzym namens Ligase, welche die DNA an der Schnittstelle wieder verbindet, wurde wenig später entdeckt. Mit dieser Entdeckung begann das Zeitalter der DNA-Manipulation. Man konnte nun gezielt bestimmte Stücke aus DNA-Fäden herausschneiden. Wenig später gelang es, ein Stück DNA aus einem Organismus in ein Plasmid einzusetzen. 1977 entdeckten Louise CHOW und Richard ROBERTS und unabhängig davon Phillip SHARP, dass bei eukaryoten Organismen die Gene mit nicht-kodierenden Sequenzen unterbrochen sind und nannten diese „Introns“. Außerdem wurden im selben Jahr von Allan MAXAM und Walter GILBERT und von Frederick SANGER zwei verschiedene Methoden der DNA-Sequenzierung etabliert (siehe Kasten 3) und 1988 wurde dann von Kary MULLIS die PCR erfunden (siehe Kasten 2).

Diese zwei zentralen Methoden der Molekularbiologie, die PCR und das Sequenzieren, ermöglichen heute die Entschlüsselung ganzer Genome. 1990 wurde das „human genome project“ gestartet, und zwar mit dem Ziel, alle Gene auf jedem Chromosom des Menschen zu finden und letztlich aufzuklären, welche Proteine sie kodieren. Im selben Jahr wurde die erste Gen-Therapie zugelassen. Immunglobulin-Gene wurden in weiße Blutkörperchen eingebaut und diese dann wieder dem Patienten verabreicht. 1995 publizierten J. Craig VENTER, Hamilton SMITH und Claire FRASER das erste vollständige Genom eines nicht viralen Organismus, des Bakteriums *Haemophilus influenzae*, und bereits 1996 war das gesamte Genom der Bierhefe, *Saccharomyces cervisiae*, aufgeklärt. 1997 gab das Roslin-Institut in Edinburgh die Geburt des ersten geklonten Säugetieres, des Schafes Dolly, bekannt und 1999 war das erste menschliche Chromosom, nämlich das Chromosom 22, vollständig durchsequenziert. Seit dem Jahr 2000 schließlich, ist das gesamte menschliche Genom als Rohsequenz bekannt (MORANGE 1998; SUMMERS 2001).

3 Grundlagen der Molekularbiologie

3.1 Struktur der DNA

Die DNA ist ein polymeres Molekül aus linearen, unverzweigten Ketten monomerer Untereinheiten, sogenannter Nukleotide. Jedes Nukleotid besteht aus drei Teilen: einem Zucker, einer Phosphat-Gruppe und einer Base (Abb. 1). In der DNA ist der Zucker, im Gegensatz zur RNA, eine 2'Desoxyribose und die Basen sind Adenin (A), Cyto-

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

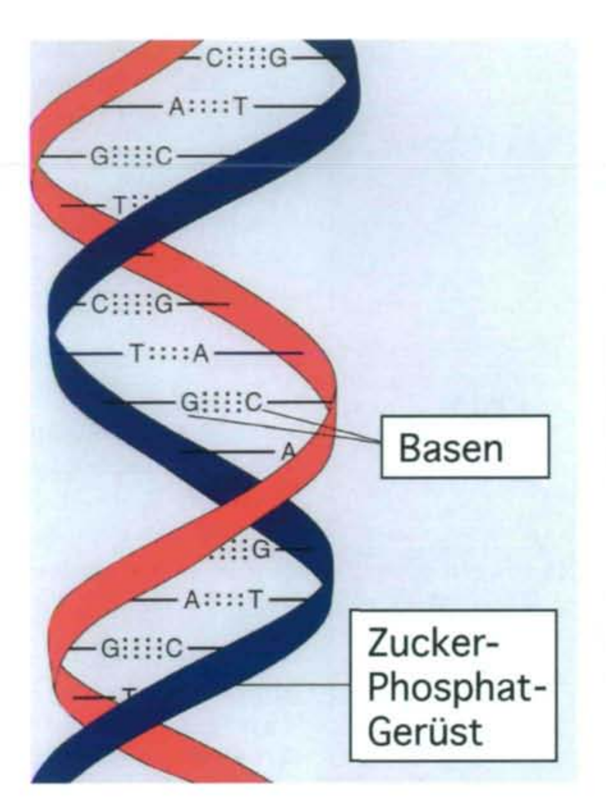


Abb. 2: Die DNA-Doppelhelix. Ein DNA-Molekül besteht aus 2 antiparallelen Strängen. Jeder Strang besteht aus einem Zucker-Phosphat-Gerüst und den vier Basen (A, C, G, T). Die beiden Stränge sind über Wasserstoffbrücken zwischen den jeweils komplementären Basen miteinander verbunden und als Doppelhelix ineinander gewunden.

(Modifiziert nach http://library.tedankara.k12.tr/chemistry)

Tab. 1: Genomgrößen (Parasiten fettgedruckt) (modifiziert nach TARLETON & KISSINGER 2001).

Organismus	Genomgrösse (in MB)
PROKARYOTE	
Mycoplasma genitalium	0,58
Escherichia coli	4,64
EUKARYOTE	
PROTOZOA	
Plasmodium falciparum	25
Theileria parva	~10
Babesia bovis	9,4
Toxoplasma gondii	~80
Eimeria tenella	~60
Cryptosporidium parvum	~10
Leishmania major	33,6
Trypanosoma cruzi	40
Entamoeba histolytica	~20
Giardia lamblia	12
ANIMALIA	
Caenorhabditis elegans	100
Brugia malayi	100
Onchocerca volvulus	~150
Schistosoma mansoni	270
Homo sapiens	3000

sin (C), Guanin (G) und Thymin (T). Bei Adenin und Guanin handelt es sich um Purine, während Thymin und Cytosin zu den Pyrimidinen gehören.

Die Nukleotide sind untereinander durch Phosphodiester-Brücken verbunden und bilden ein DNA-Polymer, oder auch Polynukleotid, welches eine Länge von mehreren Millionen Nukleotiden haben kann.

Die DNA in lebenden Zellen ist doppelsträngig, besteht also aus zwei Polynukleotiden, die in einer sogenannten Doppelhelix ineinander gewunden sind (Abb. 2). Die beiden Stränge der Doppelhelix werden über Wasserstoffbrückenbindungen, welche zwischen den Basen-Anteilen der Nukleotide zur Wirkung kommen, zusammengehalten, wobei sich A mit T und G mit C paart. Die zwei Einzelstränge sind somit zueinander komplementär.

3.2 Gene und Genome

Die biologische Information eines Organismus ist in der Nukleotid-Sequenz seiner DNA- oder RNA-Moleküle gespeichert und ist in diskrete Einheiten, sogenannte Gene unterteilt.

Die Gesamtheit aller Gene eines Individuums bezeichnet man als sein Genom. Bei jeder Zellteilung muss eine Kopie des gesamten Genoms hergestellt werden. Die DNA-Replikation muss deshalb ausgesprochen genau ablaufen. In einigen Fällen, wie beispielsweise bei der Sichelzellenanämie ist eine sogenannte Punktmutation, also der Austausch eines einzigen Basenpaars, für die Krankheit verantwortlich.

Parasiten haben im Gegensatz zu Bakterien recht große Genome (Tab. 1). Es ist aber durchaus nicht so, dass die Größe des Genoms oder die Anzahl der Chromosomen eine Aussage über die Komplexität des jeweiligen Organismus zulässt. Während der indische Bellhirsch nur 3 Chromosomenpaare hat, hat das Schaf 27. Die Amöbe *Amoeba dubia* besitzt sogar einige hundert Chromosomen und über 600 Milliarden Basenpaare! Im Vergleich dazu, umfasst das menschliche Genom nur etwa 3 Milliarden Basenpaare (KNIGHT 2002).

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

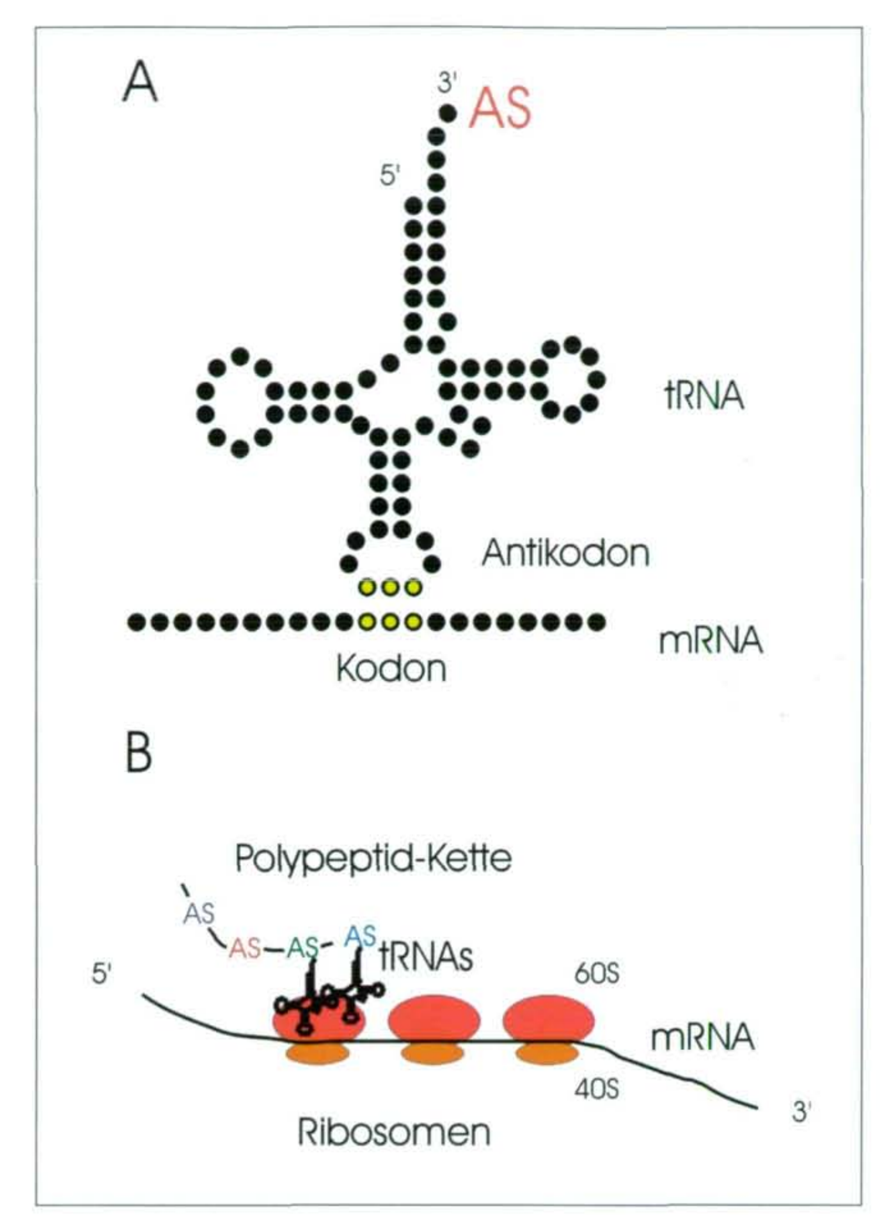


Abb. 3: Protein-Synthese an den Ribosomen. Die tRNA hat eine kleeblattförmige Sekundärstruktur und trägt am ihrem 3'-Ende die durch das jeweilige Triplett (Antikodon) kodierte Aminosäure (**A**). Die Protein-Synthese findet an den Ribosomen statt. Bei Eukaryoten bestehen die Ribosomen aus je einer kleinen, 40S, und einer großen, 60S, Untereinheit. Hier lagert sich genau jene tRNA an die mRNA an, welche das zum Kodon der mRNA komplementäre Antikodon aufweist. Die tRNA-gebundene Aminosäure wird an die wachsende Peptidkette geknüpft, die leere tRNA wird entlassen, und das Ribosom bewegt sich um eine Triplett-Länge an der mRNA entlang (**B**). (Orig.)

Die Enzyme, die diese sogenannte Transkription durchführen heißen RNA-Polymerasen. Hierbei werden an das 3'-OH-Ende einer wachsenden RNA-Kette einzelne Nukleotide angeheftet, und zwar wird immer die zum Originalstrang komplementäre Base eingebaut. In der RNA nimmt die Base Uracil die Stelle des Thymins in der DNA ein. Die Geschwindigkeit der RNA-Synthese liegt bei 20-60 Polymerisationsschritten pro Sekunde (bei 37 °C).

Es gibt verschiedene RNA-Typen. Die sogenannte messenger RNA (mRNA) dient als Vermittler zwischen einem Gen und seinem Expressionsprodukt, dem Protein. Bei der Proteinsynthese nehmen die tRNAs eine zentrale Rolle ein, denn sie dirigieren die richtige Aminosäure an die von der mRNA vorgegebene Position (Abb. 3a). Jede tRNA verfügt über eine exponierte Dreiergruppe von Nukleotiden, ein sogenanntes Triplett, und über eine Aminosäure. Es lagert sich immer genau jene tRNA an die mRNA an, welche das zur mRNA komplementäre Triplett aufweist. Die Dreiergruppe von Nukleotiden auf der tRNA nennt man Antikodon – sie ist komplementär zum Kodon der mRNA und entspricht somit dem Triplett in der DNA. Da es über 60 verschiedene Kodons gibt, muss es auch über 60 verschiedene tRNA-Arten geben. Allerdings gibt es nur 20 Aminosäuren und so übertragen manche tRNAs trotzt unterschiedlicher Kodons dieselbe Aminosäure. Man bezeichnet diese als synonyme tRNA-Arten.

Die mit je einer Aminosäure beladenen tRNA-Moleküle treffen sich mit der mRNA an den Ribosomen, hier läuft die Proteinsynthese ab. Bei Eukaryoten bestehen die Ri-

3.3 Proteine und Expression

Gene kodieren Proteine und zwar jedes Gen ein Protein, wobei immer drei Basen für eine Aminosäure stehen. Um die biologische Information, die in einem Gen enthalten ist, nutzen zu können, muss die DNA in RNA transkribiert werden, denn nur so kann die Information aus dem Zellkern geschleust und schließlich zum Bau von Proteinen eingesetzt werden.

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

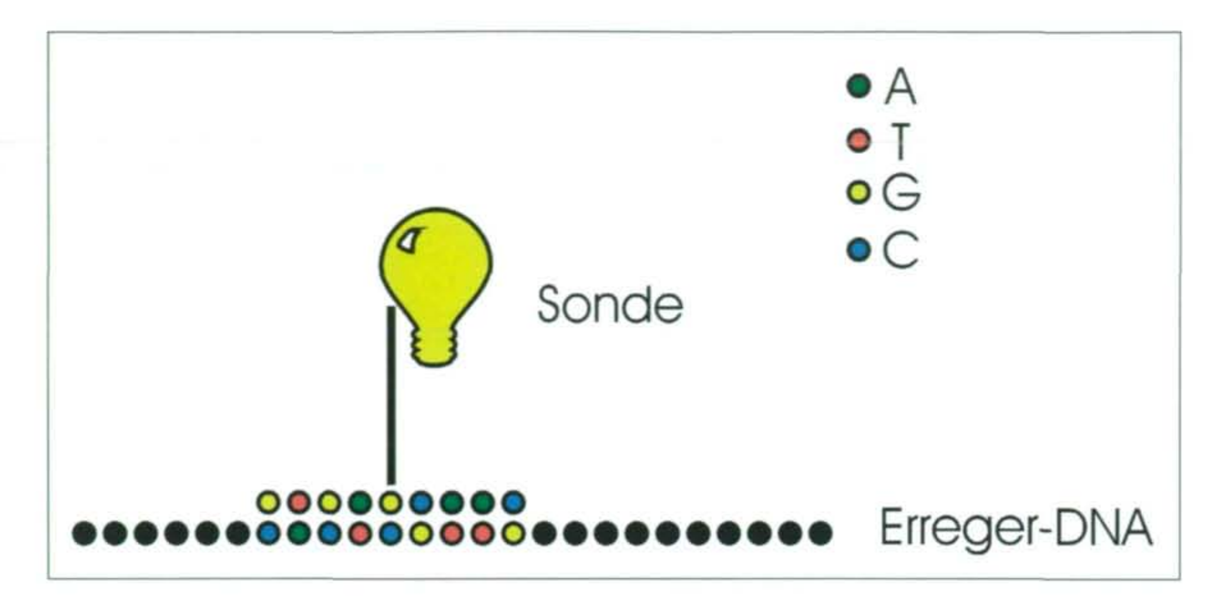


Abb. 4: DNA-Hybridisierung. Ein markiertes DNA-Fragment, die sogenannte DNA-Sonde, bindet sich an das komplementäre Stück in der genomischen DNA des Erregers, welche auf einem festen Trägermedium immobilisiert ist. (Orig.)

bosomen aus je einer kleinen (40S) und einer großen (60S) Untereinheit, wobei die kleine Untereinheit aus einer 18S rRNA und 30 Proteinen und die große Untereinheit aus einer 28S, einer 5,8S und einer 5S rRNA und 50 Proteinen besteht. Die kleine und die große Untereinheit lagern sich zu einer funktionellen Einheit, dem Ribosom zusammen und diese sind als sogenannte Polysomen wie Perlen an einer Kette an der mRNA aufgereiht (Abb. 3b).

4 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden spielen in der medizinischen Mikrobiologie eine ganz wesentliche Rolle. Die genaue Typisierung eines Erregers ist nicht nur in der Diagnostik, sondern auch in der Behandlung und der Überwachung von Infektionskrankheiten von fundamentaler Bedeutung (WILLIAMS et al. 1999).

Die ersten molekularbiologischen Methoden zum Erregernachweis basierten auf Hybridisierungstechniken unter Verwendung spezifischer DNA-Sonden. Durch die Erfindung der PCR war dann mit einem Schlag ein Nachweis und eine gleichzeitige Differenzierung von vorher nicht gekannter Sensitivität möglich.

4.1 Hybridisierung

Die DNA-Hybridisierung basiert darauf, dass genomische DNA auf einem festen Trägermedium immobilisiert und mit einem markierten DNA-Fragment, der sogenannten Sonde, hybridisiert wird. In einem Waschschritt werden dann alle ungebundenen Fragmente entfernt, sodass nur spezifisch gebundene DNA-Sonden hängen bleiben, welche mittels Autoradiographie oder Chemilumineszenz nachgewiesen werden können (Abb. 4).

Der große Vorteil der DNA-Hybridisierung liegt darin, dass es sich hierbei um eine sehr schnelle Nachweismethode handelt. Darüber hinaus kann diese Methode, sofern sie ohne Radioaktiv-Sonden durchgeführt wird, auch außerhalb des Labors angewendet werden. Der Hauptnachteil der DNA-Hybridisierung liegt in der Notwendigkeit einer relativ großen Menge qualitativ reiner Ausgangs-DNA.

4.2 RFLP (= Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLPs oder Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen basieren darauf, dass nach Inkubation der genomischen DNA eines Organismus mit sogenannten Restriktionsendonukleasen DNA-Fragmente unterschiedlicher, für diesen Organismus spezifischen Länge entstehen.

Restriktionsendonukleasen (RENs) sind bakterielle Enzyme, die in der Lage sind, DNA an bestimmten Erkennungssequenzen zu zerschneiden. Wenn sich zwei Organismen nun in ihrer DNA-Sequenz voneinander unterscheiden, ergibt dies auch ein unterschiedliches Schnittmuster der Restriktionsenzyme; oft genügt der Unterschied in einem einzigen Basenpaar und das Restriktionsenzym muss an einer anderen, passenden Stelle schneiden. Auf diese Weise kommt es zu Längenunterschieden

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Kasten 2:

Erfindung der PCR



Als Kary MULLIS, im Frühjahr 1983 gerade auf dem Weg zu seinem Wochenendhaus war, hatte er folgende Idee: er sollte einen diagnostischen Test zum Nachweis der Einzel-Basenpaar-Mutation, welche für die Sichelzellenanämie verantwortlich ist, etablieren. Seine Überlegung war nun, dass man anstatt die Sensitivität zu erhöhen, auch das Zielmolekül amplifizieren könnte, indem man spezifische Primer und eine DNA-Polymerase zur Replikation der Sequenz einsetzt. Er erkannte, dass man diesen Vorgang immer und immer wieder wiederholen kann, Zyklus um Zyklus, und so das Zielmolekül exponentiell vermehren kann. Dies war die Geburtsstunde der PCR.

Im Dezember 1985 veröffentlichte MULLIS zusammen mit Kollegen die Ergebnisse seiner ersten praktischen Versuche zu dieser Idee in der angesehenen Zeitschrift Science (SAIKI et al. 1985). Die Methodik der PCR wurde dann 1987 publiziert. Die anfangs benutzte DNA-Polymerase wurde aus *E. coli* gewonnen. Diese Polymerase ist jedoch hitzeempfindlich, sodass sie nach jeder Denaturierung der Reaktion neu hinzugegeben werden musste. Außerdem konnte der Polymerisationsschritt nur bei 37 °C erfolgen, was oft zu unerwünschten Nebenprodukten führte. 1988 gelang es SAIKI und Kollegen, eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* zu isolieren. Dementsprechend heißt die seitdem verwendete Polymerase „Taq"-Polymerase. Bereits 1985 wurde das erste Patent für automatisierte Thermocycler eingereicht. Heute stehen uns nicht nur vollautomatisierte PCR-Geräte, sondern auch weiterführende Techniken wie Real-Time-PCR oder „in situ"-PCR zur Verfügung.

MULLIS wurde am 28. Dezember 1944 in Lenoir, North Carolina, geboren. Bereits als Kind begeisterte er sich für die Naturwissenschaften und schon während seines Studiums betrieb er ein Chemielabor in einem ehemaligen Hühnerstall. Nach seinem Studium der Biochemie und einer Postdoc-Stelle als Neurochemiker, begann er, sich für die Molekularbiologie zu interessieren. 1979 nahm er eine Position als Molekularbiologe bei der Firma Cetus an, wo er dann seine bahnbrechenden Untersuchungen durchführte. MULLIS erhielt für seine die gesamte Biologie revolutionierende Erfindung der PCR im Oktober 1993 den Nobelpreis für Chemie.

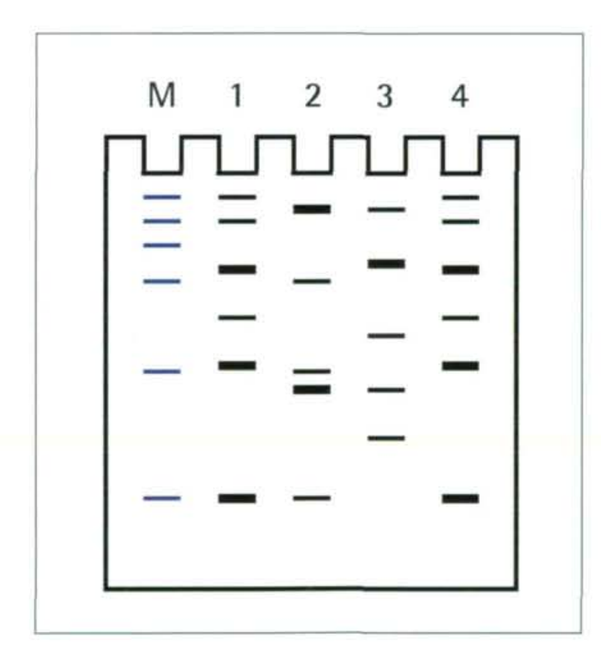


Abb. 5: RFLP-Muster. Die Erreger-DNA wird mit sogenannten Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die erhaltenen DNA-Fragmente werden auf einem Gel ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei ein für den jeweiligen Erreger charakteristisches Bandenmuster entsteht. M: Größen-Marker; 1-4: Proben. Probe 1 und Probe 4 zeigen dasselbe Bandenmuster, es dürfte sich also um denselben Erreger handeln. (Orig.)

bei den Restriktionsfragmenten – es besteht ein Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP). Bei gelelektrophoretischer Auftrennung (sogenannter Molekularsiebung nach der Größe der Fragmente) ergibt sich dann für jeden Organismus ein spezifisches Bandenmuster (Abb. 5).

Die Sensitivität und Spezifität dieser Methode kann noch gesteigert werden, indem man einzelne Banden mit Gensonden hybridisiert. Dies sind komplementäre Sequenzen, die entweder durch radioaktive Isotope oder durch fluoreszierende Gruppen markiert werden. So können bestimmte Banden mittels Fluoreszenz oder, falls radioaktiv markiert, durch ein Autoradiogramm (Auflage eines Röntgenfilms) nachgewiesen werden.

4.3 PCR (= Polymerase Chain Reaction)

Ein Grundproblem in der Diagnostik ist die Sensitivität. Auch noch lange nach der Etablierung molekularbiologischer Methoden, wie etwa der Hybridisierung, stand man vor dem Problem, dass die nachzuweisende Menge DNA oft so gering war, dass sie mit den herkömmlichen molekularbiologischen Analysemethoden nicht nachweisbar war. Mit einem Schlag wurde das Problem durch eine geradezu geniale Idee und eine revolutionierende Erfindung gelöst: Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction oder PCR) ermöglicht den Nachweis geringster Mengen genetischen Materials.

Die Grundidee der PCR ist, kleinste Mengen genetischen

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

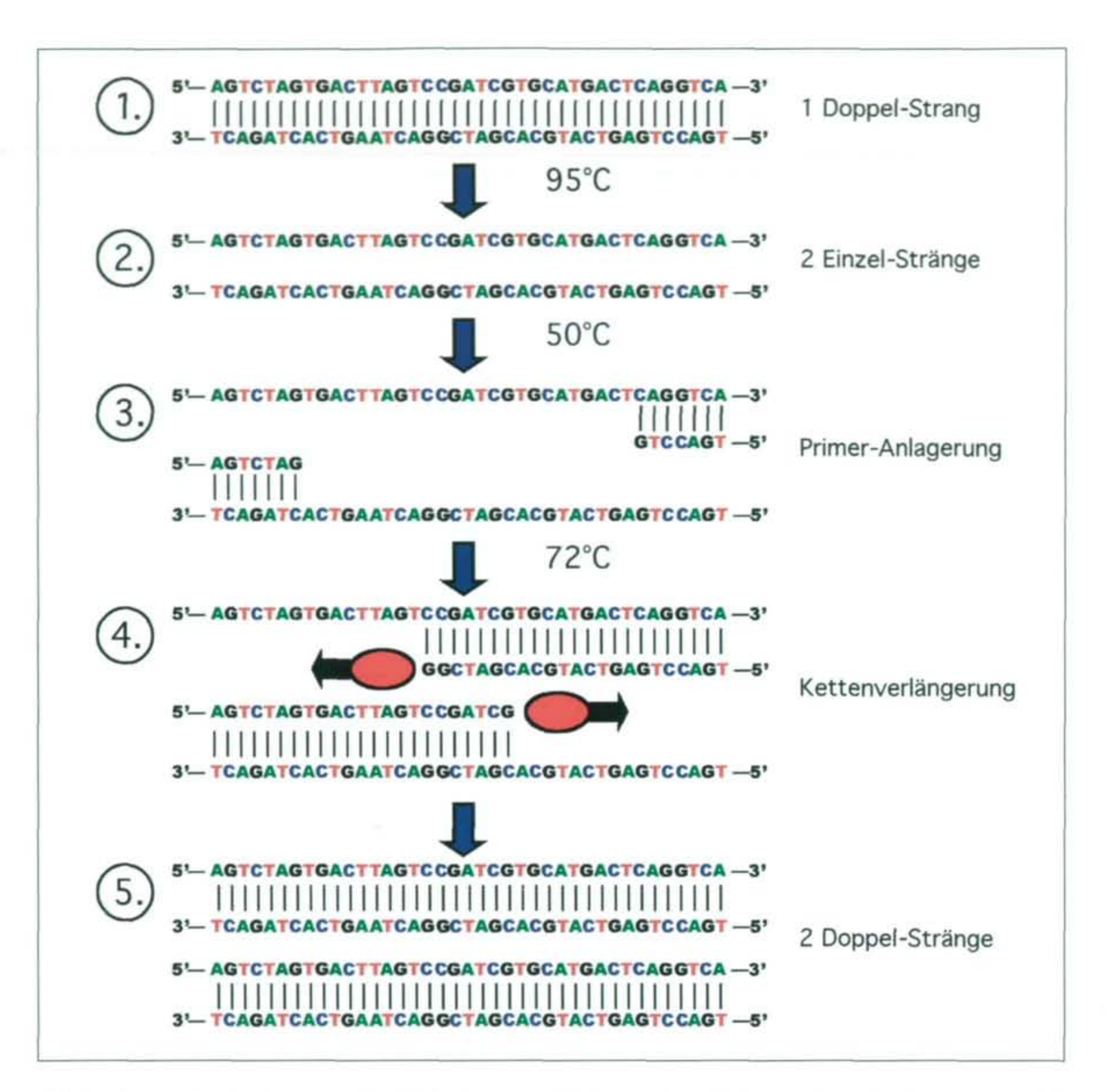


Abb. 6: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus. **1**. Ausgangsmaterial ist ein Stück doppelsträngige DNA. **2**. Die Probe wird erhitzt, die Wasserstoffbrückenbindungen lösen sich, der Doppelstrang zerfällt in zwei Einzelstränge. **3**. Die Primer binden sich an den jeweils komplementären Einzelstrang. **4**. Die Polymerase verlängert die Primer in 3'-Richtung. **5**. Es entstehen zwei Doppelstränge. Diese dienen im nächsten Zyklus als Ausgangsmaterial, d.h. es kommt zu einer exponentiellen Vermehrung. (Orig.)

Materials so weit zu vervielfältigen, bis dieses mit herkömmlichen Methoden nachweisbar ist. Und zwar wird ein Stück DNA (z.B. ein Gen) durch Hinzugabe kurzer Oligonukleotide, sogenannter Primer, sowie der einzubauenden Einzelnukleotide und mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase exponentiell vervielfältigt. Das Enzym DNA-Polymerase hat in lebenden Zellen die Aufgabe, defekte DNA-Stränge zu reparieren und benötigt daher einen kurzen intakten Doppelstrang, um mit der Synthese des neuen Stranges zu beginnen. Bei der PCR wird diese Situation durch die Primer, welche sich dann an die Einzelstränge anlagern, geschaffen. Da die DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung arbeitet, muss sich der Primer am 3'-Ende der zu polymerisierenden DNA anbinden. Die gewählten Primer müssen also jeweils komplementär zu dem 3'-Ende eines DNA-Stranges sein. Der Primer darf in der Anzahl seiner Nukleotide weder zu lang noch zu kurz sein. Ist er zu kurz, so hybridisiert er unspezifisch, ist er zu lang, steigt die Hybridisierungszeit. In der Regel verwendet man daher Primer mit einer Länge von etwa 18-30 Basenpaaren. Zu hohe Konzentrationen der Matrizen-DNA verringern ebenfalls die Ausbeute der PCR, da, wenn zu viele Originalstränge (= Matrizen) vorliegen, diese sich eher aneinander binden als an die Primer.

Der Ablauf einer PCR ist in Abbildung 6 schematisch dar-

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

gestellt. Die (doppelsträngige) Matrizen-DNA wird durch Hitzebehandlung (95 °C) denaturiert, sodass sich die zwei Einzelstränge voneinander trennen. Die Reaktion wird dann auf etwa 50 °C (abhängig von den jeweiligen Primern) abgekühlt. Bei dieser Temperatur hybridisieren die Primer an die Einzelstränge. Durch erneute Erwärmung (auf 72 °C) beginnt die DNA-Polymerase, die Primer in 3´-Richtung zu verlängern, wobei sie jeweils die zur Matrize komplementären Einzelnukleotide an den wachsenden DNA-Strang anhängt. So werden, ausgehend von den Primern, zwei neue DNA-Stränge synthetisiert, die dann in dem nächsten PCR-Zyklus selbst als Matrize dienen können. Bei jedem Zyklus wird also die gesamte vorhandene Ausgangs-DNA verdoppelt – es kommt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA.

In der Regel werden 20-30 Zyklen durchlaufen. Rein theoretisch beträgt der Amplifikationsfaktor nach 20 PCR-Zyklen etwa 10^6, d.h. aus einem doppelsträngigen DNA-Molekül können 1 Million doppelsträngige Moleküle entstehen. Die tatsächliche Amplifikationsrate ist allerdings deutlich niedriger, da die Ausbeute pro Zyklus nur 85 % beträgt. Die Fehlereinbaurate liegt bei über 30 Zyklen etwa bei 0,25 %, d.h., dass eine von 400 Basen falsch gelesen wird. Diese Fehler gehen generell auf Fehleinbau, besonders T/C-Transitionen zurück. Wichtig für den Erregernachweis ist, dass es nicht zu einer Kontamination mit Fremd-DNA kommt, da sonst falsch-positive Ergebnisse auftreten können.

Das Reaktionsprodukt, oder Amplifikat, kann mittels verschiedener Techniken weiter analysiert werden. Die wohl einfachste Methode ist die Bestimmung der Länge des PCR-Produkts durch gelelektrophoretische Auftrennung. Die synthetisierte DNA kann mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Ethidium-Bromid) angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch Einsatz spezifischer Hybridisierungssonden kann eine noch höhere Sensitivität und Spezifität erreicht werden (sogenanntes Southern-Blotting). Eine weitere Möglichkeit ist, während der Hybridisierung ein Restriktionsenzym zuzugeben, mit dem man schließlich verschiedene Restriktionsstellen und damit Mutanten oder einzelne Genotypen nachweisen kann. Das heißt, man kann mit dieser Oligonukleotidrestriktion die Verteilung einzelner Restriktionsstellen innerhalb bestimmter Gene nachweisen. Zahlreiche Krankheiten, die auf Punktmutation beruhen oder zumindest nur ein Gen betreffen, lassen sich so diagnostizieren, wie etwa auch die Sichelzellenanämie. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Spezifität ist das Einsetzen von geschachtelten Primern. Das Prinzip ist, ein weiteres Primerpaar einzusetzen, dessen Sequenzen innerhalb des ersten Paares liegen. Das zweite Primerpaar liefert ein Teilfragment des vorher synthetisierten Produkts. Da diese Methode auf 4 unabhängigen, aber koordinierten Hybridisierungen beruht, wird die Spezifität der Gesamtreaktion erheblich erhöht. Unspezifische Sequenzen der ersten Reaktion werden durch das zweite Primerpaar bis unter die Nachweisbarkeitsgrenze verdünnt. Die höchste Spezifität liefert schließlich die Entschlüsselung der genauen Basenfolge des gesamten DNA-Moleküls durch Sequenzierung (siehe dort).

Die PCR hat vor allem der Diagnostik zahlreiche neue Möglichkeiten eröffnet. Mit Hilfe der PCR können geringste Mengen DNA, theoretisch ein einziges DNA-Molekül eines Erregers nachgewiesen werden. Zwar dient in der Regel doppelsträngige DNA als Matrize, jedoch kann auch RNA als Probenmaterial eingesetzt werden. Diese muss nur zuerst mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in die sogenannte cDNA (complementary DNA), welche dann in der PCR als Matrize fungiert, umgeschrieben werden. Durch Einsatz von RNA als Probenmaterial lassen sich Aussagen über den Expressionszustand einzelner Gene machen und dies hat unmittelbar klinischen Bezug, da so zum Beispiel zwischen einer latenten und einer aktiven Infektion unterschieden werden kann (WILLIAMS et al. 1999).

Als Probenmaterial eignen sich Blut, Urin, Biopsie- und Autopsiematerial, Wasser- und Bodenproben, Fossilien, Haare, einzelne Zellen und auch fixierte und eingebettete Gewebe. Es kann sogar archäologisches Material untersucht werden, was vor allem für epidemiologische und evolutionsbiologische Untersuchungen von Interesse ist. Es konnten bereits Fragmente der ribosomalen DNA von 425 Milliarden Jahre alten aus Salzgestein-Proben isolierten Bakterien mittels PCR amplifiziert werden (FISH et al. 2002).

4.4 RAPD (= Random Amplified Polymorphic DNA)

Durch die PCR ist es möglich, selektiv ganz spezifische Zielsequenzen aus einem heterogenen Gemisch, wie der genomischen DNA, in vitro zu amplifizieren. DNA-Polymorphismen hingegen lassen sich auch dann nachweisen, wenn die Basensequenz unbekannt ist und dies gelingt mit Hilfe der RAPD-Technik (oder auch arbitrarily primed PCR genannt), also durch zufällig vervielfältigte DNA bzw. durch willkürlich gestartete PCR.

Bei dieser PCR binden sich kurze Primer bekannter Sequenz an ihren komplementären Bindungsort in der Pro-

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Kasten 3:

Frederick Sanger



Die am häufigsten angewendete Methode zur Entschlüsselung von DNA ist die DNA-Sequenzierung nach Sanger. Der englische Biochemiker Frederick Sanger wurde 1918 in Rendcomb (Gloucestershire) geboren und lehrte von 1944 bis 1983 als Professor an der Universität von Cambridge. Er konnte 1953 die Aminosäuresequenz des Insulins aufklären und entwickelte in den 70er Jahren die Kettenabbruch-Methode zur Sequenzanalyse von DNA (Sanger et al. 1977). Sanger erhielt für seine Arbeiten 1958 und 1980 den Nobelpreis für Chemie.

ben-DNA, der jedoch nicht bekannt, sondern rein zufällig ist. Statistisch gesehen befindet sich in einem großen Genom alle 10^6 Basen ein zu einem solchen Primer komplementärer Bindungsort. Die Anzahl der zwischen diesen Bindungsorten liegenden Basen bestimmt, ob dieser durch die Primer eingegrenzte Bereich amplifiziert wird oder nicht. Außerdem hat die für die Synthese eingestellte Zeit einen Einfluss darauf, ob ein eingegrenzter Bereich amplifiziert werden kann. Nur wenn innerhalb der vorgegebenen Zeit ein Strang von einem Bindungsort zu einem zweiten synthetisiert wird und die Bindungsorte innerhalb von etwa 5000 Basenpaaren liegen, erhält man nach der PCR ein Amplifikationsprodukt.

Die RAPD-Fingerprinting Methode gliedert sich in die Arbeitsschritte DNA Isolierung, Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Gelelektrophorese und Nachweis der amplifizierten Banden. Das erzielte Bandenmuster ist in der Regel hochspezifisch. Der große Vorteil dieser Methode liegt in dem relativ geringen Arbeitsaufwand. Es können schnelle Ergebnisse für die Untersuchung der genetischen Variabilität innerhalb und zwischen Populationen erzielt werden.

4.5 DNA-Sequenzierung

Unter Sequenzieren versteht man die Entschlüsselung der Reihenfolge der Nukleotide bzw. Basen in einem bestimmten DNA-Stück. Grundsätzlich kann die Sequenzierung von DNA nach zwei verschiedenen Prinzipien durchgeführt werden. Einerseits durch Zerlegung eines DNA-Fragments in alle denkbaren, unterschiedlich langen DNA-Bruchstücke (Verfahren nach Maxam und Gilbert), oder, andererseits, durch Synthese aller denkbaren, unterschiedlich langen DNA-Einzelstränge komplementär zu dem zu sequenzierenden DNA-Fragment (Verfahren nach Sanger). Im Gegensatz zum Maxam-Gilbert-Verfahren, bei dem das zu sequenzierende DNA-Fragment zuerst isoliert und gereinigt werden muss, erlaubt es die Sanger-Methode, ein DNA-Fragment direkt im biologischen Material zu sequenzieren. Die Methode nach Sanger, welche auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet wird, hat sich daher in den letzten Jahren durchgesetzt.

Als Ausgangsmaterial werden 1 bis 10 µg einzelsträngiger DNA benötigt. Liegt die DNA doppelsträngig vor, so muss sie zuerst bei 95 °C denaturiert werden. Eine DNA-Sequenzierung umfasst die Schritte DNA-Isolierung, PCR, Sequenzier-PCR, gelelektrophoretische Auftrennung und Detektion. Die Sequenzier-PCR unterscheidet sich von der normalen PCR dadurch, dass nur ein Primer (Oligonukleotid) eingesetzt wird. Bei unbekannter Sequenz der Probe kann mit Hilfe von Enzymen ein bekannter DNA-Abschnitt in die Probe integriert werden. Außerdem wird zusätzlich zu den Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dATP, dTTP, dGTP und dCTP) eine geringe Konzentration von mit radioaktivem Phosphor markierten Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP) zugegeben. Wird ein Didesoxyribonukleosid-Triphosphat in den neuen Strang eingebaut, so kann die DNA-Polymerase aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am C_3-Atom die Synthese nicht fortsetzen und fällt vom Strang ab. So erhält man nach etwa 30 Zyklen alle möglichen, sich in ihrer Länge jeweils um nur ein einziges Nukleotid unterscheidenden Stranglängen, bis hin zum komplett synthetisierten Strang. Die Proben werden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei die DNA-Fragmente, abhängig von ihrer Größe, unterschiedlich schnell zum Pluspol wandern. Dadurch, dass immer die letzte Base eines Stranges markiert ist, kann die Sequenz dann auf einem Röntgenfilm abgelesen werden. Heute wird allerdings hauptsächlich mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden gearbeitet, was eine vollautomatische Sequenzierung durch Laser-Detektion erlaubt.

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Auf diese Weise können nicht nur die Sequenzen einzelner DNA-Fragmente sondern ganzer Genome entschlüsselt werden. Das erste vollständig entschlüsselte Genom eines vielzelligen Organismus war das von *Caenorhabditis elegans*, einem Nematoden. In der Parasitologie bestehen Genomprojekte für *Brugia malayi, Fasciola hepatica, Leishmania, Plasmodium* und *Entamoeba* (BLAXTER et al. 1999; DEGRAVE et al. 2001; TARLETON & KISSINGER 2001). Durch die Kenntnis der gesamten Genome von Krankheitserregern eröffnen sich unzählige neue Möglichkeiten, sowohl in der Diagnostik, als auch in der Behandlung und Prävention parasitärer Erkrankungen.

4.6 Klonieren

Ein Klon ist eine Bakterien- oder Zellkolonie, die sich durch Teilung aus einer einzigen Zelle gebildet hat. Alle Zellen dieser Kolonie besitzen also eine identische genetische Ausstattung. Unter Klonieren versteht man das Heranzüchten einer Gruppe von Organismen, die dasselbe rekombinante DNA-Molekül enthalten.

Hierzu wird in der Regel das betreffende Gen oder Gen-Fragment zuerst aus einem Organismus isoliert, wobei der erste Schritt zur Klonierung ist, von einem solchen Organismus eine Genbank anzulegen, d.h. seine gesamte Geninformation oder zumindest einen spezifischen Teil davon in kleinen „Portionen" in fremden Zellen (meist *Escherichia coli*) zu speichern. Die DNA wird mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend gelelektrophoretisch analysiert. Dann werden spezifische DNA-Fragmente hergestellt, in einen Vektor (Plasmid) eingebaut und in den Empfängerorganismus, also in das Bakterium eingeschleust. Dieser Vorgang des gezielten Einbringens von fremder DNA in einen Wirtsorganismus, aus dem dann Nachkommen mit der rekombinanten DNA gezogen werden, wird Klonierung genannt. Neukombinierte DNA aus Bakterien-DNA und eingesetzter DNA wird rekombinante DNA genannt. Das Bakterium vermehrt sich – und somit auch das eingeschleuste DNA-Fragment – und erzeugt mit jeder Zellteilung, also etwa alle 20 Minuten, eine identische Kopie der eingebauten DNA. In einer Stunde kann man auf diese Weise 2^3, also acht Kopien des eingeschleusten DNA-Fragments gewinnen.

Die Wirtsorganismen exprimieren die eingefügte DNA wie ihre eigene, d.h. sie stellen deren Gen-Produkte (Proteine) her. Dieser Mechanismus ist von zentraler Bedeutung für die Genomforschung. Wenn man ein Gen findet, dessen Aufgabe im Körper aber nicht kennt, kann man es in einem Bakterium exprimieren und so gezielt das Protein finden, das es kodiert.

Gen-Klonierung bzw. rekombinante DNA-Technik sind inzwischen Standardmethoden in den Biowissenschaften und haben unzählige Anwendungen in der Medizin, Biotechnologie und eben der Genomforschung gefunden. So kann beispielsweise ein immunogenes Parasitenprotein kloniert werden und dann in der Serodiagnostik eingesetzt werden.

5 Einsatz von molekularbiologischen Methoden in der Parasitologie

Molekularbiologische Methoden sind nicht nur in der Diagnostik von Parasitosen von großem Wert, sondern auch in vielen anderen Gebieten, wie der Epidemiologie und Populationsgenetik, der Entwicklung neuer Wirk- und Impfstoffe und vor allen Dingen der Phylogenie (GASSER 1998; MCKEAN et al. 1999).

5.1 Diagnostik

Die drei Meilensteine in der Diagnostik von Infektionskrankheiten sind Mikroskopie, Immunologie und Molekularbiologie. Besonders die Erfindung der PCR hat die Diagnostik geradezu revolutioniert und bereits mit der Publikation der PCR wurde die erste Anwendungsmöglichkeit beschrieben: die pränatale Diagnostik der Sichelzellenanämie. Die Sichelzellenanämie beruht auf einer Punktmutation, gegenüber dem Wildtypallel ist beim Sichelzellenallel eine Base vertauscht und dadurch wird eine Restriktionsschnittstelle zerstört. In der Diagnostik wird ein 110 bp langer Abschnitt, der diese Restriktionsschnittstelle überspannt, amplifiziert und untersucht. Gesunde zeigen zwei Fragmente, Kranke haben nur ein ungeschnittenes Fragment, und heterozygote Träger zeigen ein Muster aus 3 Fragmenten (ein ungeschnittenes und zwei geschnittene). Die Diagnose lässt sich durch die PCR innerhalb von 10 Stunden stellen, während mit herkömmlichen Diagnostikmethoden mehrere Tage nötig sind. Diese Methode zum Nachweis von Punktmutationen lässt sich auch bei anderen Krankheiten, wie der Phenylketonurie, b-Thalassämie und der Hämophilie A und B anwenden.

Die parasitologische Diagnostik war eines der letzten Fachgebiete, in das molekularbiologische Methoden Einzug gehalten haben, und zwar hauptsächlich deswegen, weil sich die meisten Parasiten schon mikroskopisch recht gut nachweisen lassen. Viele molekularbiologische Techniken erfordern einen oft erheblichen Geräteaufwand und sind darüber hinaus sehr kostspielig, sodass deren Einsatz

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

nur in Einzelfällen oder in Spezialfragestellungen der parasitologischen Diagnostik zu rechtfertigen ist.

Wichtige Anwendungsgebiete molekularbiologischer Methoden in der parasitologischen Diagnostik sind etwa die Detektion einer reaktivierten *Toxoplasma gondii*-Infektion bei AIDS-Patienten, der Nachweis von Koinfektionen mit *Plasmodium falciparum* und *P. vivax*, die Differenzierung zwischen der pathogenen *Entamoeba histolytica* und der apathogenen *E. dispar* und der Nachweis therapieresistenter *Plasmodium* spp. Stämme. Bei diesen Ausnahmen ist entweder die Parasitendichte sehr niedrig oder eine Unterscheidung zwischen morphologisch nicht differenzierbaren Organismen nötig oder serologische Methoden lassen, z.B. wegen des Immunstatus des Patienten, keine schlüssige Aussage erwarten. In allen diesen Fällen sind molekularbiologische Techniken von unschätzbarem Wert. Darüber hinaus kann durch Anwendung molekularbiologischer Techniken in vielen Fällen sehr viel Zeit erspart werden, denn durch vollautomatisierte Testmethoden können große Probenmengen im Parallelansatz bearbeitet werden. Außerdem kann durch Anwendung molekularbiologischer Techniken auch die Parasitenlast quantifiziert werden, und dies spielt für die Behandlung eine ganz wesentliche Rolle. In der parasitologischen Diagnostik sind vor allem Hybridisierungstechniken von großer Bedeutung, und zwar aufgrund ihrer Schnelligkeit und ihres geringen Geräteaufwandes. Die Zielsequenzen sind in der Regel hochrepetitive Sequenzen, um so eine hohe Sensitivität zu erreichen. Als Schnelltests stehen RFLP und RAPD zur Verfügung; neue Technologien sind der Elektro-Rotations Assay (ERA) und die Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH). Bei einer ganzen Reihe von Parasiten sind molekularbiologische Nachweismethoden etabliert (WEISS 1995; SINGH 1997; MCKEAND 1998; MORGAN & THOMPSON 1998) und diese werden unten angeführt.

5.1.1 *Leishmania* spp.

Die Leishmaniosen sind, wegen der unbestimmten Symptome, der geringen Parasitendichte im klinischen Material und der morphologischen Ähnlichkeit, ja Übereinstimmung der *Leishmania*-Arten oft schwer zu diagnostizieren. Da auch die Kultivierung nicht immer problemlos ist und zudem nicht geringen Aufwand erfordert, haben molekularbiologische Methoden in der Diagnostik der Leishmaniosen immer mehr an Bedeutung gewonnen.

DNA-Sonden sind meist gegen die DNA des Kinetoplasten (kDNA) gerichtet. Diese ist deshalb besonders geeignet, weil sie in multiplen Kopien vorliegt. Zum Nachweis von *L. donovani* wird auch eine 60-bp Wiederholungssequenz (Lmet2) als Zielsequenz eingesetzt. Als Untersuchungsmaterial dient Blut.

5.1.2 *Trypanosoma* spp.

In der chronischen Phase von Morbus Chagas zirkulieren nur sehr wenige Parasiten im Blut. Da hier mikroskopische Techniken nicht ausreichen, haben serologische Methoden, die sogenannte Xenodiagnose, und, in den letzen Jahren, zunehmend auch molekularbiologische Methoden große Bedeutung gewonnen, und zwar vor allem zum Nachweis von chronischen Infektionen und zum Nachweis des Erregers während der asymptomatischen Phase der Infektion.

Hier kommen vor allem die Minicircle kDNA (330-bp) und eine 195-bp Satelliten DNA-Sequenz zum Einsatz. Bei der afrikanischen Schlafkrankheit dient eine 177-bp hochrepetitive Sequenz als Zielsequenz. Als Untersuchungsmaterial wird Blut verwendet.

5.1.3 *Toxoplasma gondii*

T. gondii kann beim sich entwickelnden Fötus und bei einer Reaktivierung beim Immunsupprimierten eine schwere Krankheit mit hoher Letalität hervorrufen, weshalb eine schnelle und spezifische Diagnostik von größter Wichtigkeit ist. Da die Serologie beim Immunsupprimierten schwierig ist, und beim Fötus nur schwer zwischen mütterlichen und kindlichen Antikörpern unterschieden werden kann, ist in beiden Fällen der Nachweis mittels molekularbiologischer Methoden durchaus von Bedeutung.

Zahlreiche PCR-Tests sind etabliert, wobei vor allem die Gene für das B1 und das P30 Oberflächenprotein als Zielmoleküle fungieren. Als Untersuchungsmaterial kommen Liquor, Amnion-Flüssigkeit und Nabelschnurblut zum Einsatz.

5.1.4 *Cryptosporidium parvum*

C. parvum ist ein Durchfallerreger und hat bei Immunsupprimierten große Bedeutung. Außerdem war *C. parvum* wiederholt in trinkwasserassoziierte Durchfall-Epidemien, wie den Kryptosporidiose-Ausbruch von Milwaukee involviert. Schnelle, automatisierte und hochsensitive Nachweismethoden sind also von großer Bedeutung.

Eine ganze Reihe von auf der PCR basierenden Techniken zum Nachweis von *Cryptosporidium* stehen zur Verfü-

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

gung. Außerdem wurde ein Nachweis mittels FISH-Technik etabliert. Es werden sowohl Umweltproben als auch Stuhlproben untersucht.

5.1.5 Plasmodien

In der Malaria-Diagnostik kommen molekularbiologische Methoden vor allem zum Nachweis gemischter *Plasmodium falciparum* und *P. vivax*-Infektionen oder in Fällen von geringer Parasitämie zum Einsatz. Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet ist das Herausfinden therapieresistenter *P. falciparum*-Stämme in bestimmten geographischen Regionen.

Als Zielsequenzen kommen hauptsächlich das 18S rRNA-Gen für eine PCR und die 21-bp Wiederholungssequenz zur Hybridisierung zum Einsatz. Diese Wiederholungssequenz kommt im Genom von *P. falciparum* an vielen Stellen vor, fehlt aber bei den anderen drei humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies. Das Untersuchungsmaterial ist Blut.

5.1.6 *Entamoeba histolytica*

Bei der Amöbose sind molekularbiologische Techniken vor allem von Bedeutung, um zwischen der apathogenen *E. dispar* und der pathogenen *E. histolytica* unterscheiden zu können. Ein weiterer Einsatz ergibt sich aus epidemiologischen Fragestellungen, nämlich, um den Erreger auch bei asymptomatischen Trägern nachweisen und somit einer weiteren Ausbreitung entgegenwirken zu können.

E. histolytica und *E. dispar* können anhand ihrer 18S rDNA-Sequenzen voneinander unterschieden werden. Außerdem kann auch eine 145-bp Wiederholungssequenz (P-145), die in allen pathogenen Stämmen vorkommt und nur 44 % Identität zu der 133-bp Wiederholungssequenz (B-133) von apathogenen Stämmen zeigt, als Zielsequenz eingesetzt werden. Das Untersuchungsmaterial ist Stuhl.

5.1.7 Freilebende Amöben

Molekularbiologische Nachweismethoden kommen vor allem bei den sehr seltenen Infektionen des Gehirns mit freilebenden Amöben zum Einsatz, da die Erregerdichte im Liquor meist sehr niedrig ist und serologische Methoden hier, insbesondere bei der GAE, nicht anwendbar sind. Auch bei der *Acanthamoeba*-Keratitis sind molekularbiologische Methoden durchaus von Bedeutung, da bei Akanthamöben eine Differenzierung aufgrund morphologischer Merkmale nicht möglich ist.

Die Zielsequenz für den Nachweis freilebender Amöben ist in der Regel die 18S rDNA, da so auch gleichzeitig eine Identifizierung möglich ist. Weiters werden bei *Naegleria* spp. zur Spezies-Differenzierung auch RFLPs eingesetzt. Als Untersuchungsmaterial dient bei den Infektionen des Gehirns vor allem Liquor, bei der *Acanthamoeba*-Keratitis ein Hornhautgeschabsel.

5.1.8 Mikrosporidien

Mikrosporidien sind obligat intrazellulär lebende Erreger, welche vor allem bei Immunsupprimierten, insbesondere bei HIV-Patienten, schwere Infektionen hervorrufen können. Wegen ihrer geringen Größe und der Verschiedenartigkeit des Probenmaterials ist der Nachweis mit mikroskopischen Techniken schwierig.

Ein PCR-Nachweis mit anschließender RFLP-Analyse und auch eine Nested PCR wurden etabliert und erfolgreich zum spezifischen Nachweis eingesetzt. Als Untersuchungsmaterial kommen Stuhl, Urin, Sputum, Liquor und verschiedenste Gewebeproben in Frage.

5.1.9 Mikrofilarien

Der Nachweis von Mikrofilarien ist wegen der geringen Erregerdichte, und weil die Mikrofilarien nur zu bestimmten Zeiten im peripheren Blut zu finden sind, oft schwierig. Hier bieten molekularbiologische Methoden einen enormen Vorteil.

Zum Einsatz kommen eine PCR bei *Loa loa* und die Detektion einer 150-bp Wiederholungssequenz (O-150) mit einer DNA-Sonde bei *Onchocerca volvulus*. Eine kombinierte Methode aus PCR und anschließender Hybridisierung steht bei *Brugia malayi* und *Wuchereria bancrofti* zur Verfügung. Blut dient als Untersuchungsmaterial.

5.2 Epidemiologie

Die Molekulare Epidemiologie nutzt biochemische und molekularbiologische Techniken, um die genetische Variabilität von Krankheitserregern zu erfassen, Infektionskrankheiten zu überwachen und epidemiologische Zusammenhänge aufzuklären. Es werden sowohl genetische als auch Umwelt-Faktoren, vor allem auch unter umfas-

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

sender Einbeziehung statistischer Methoden berücksichtigt. Letztlich soll durch molekulare Typisierung und Ermittlung der Pathogenität und Wirkstoff-Resistenz der Erreger und durch Identifikation von Risikogruppen in der Bevölkerung eine optimale Therapie bzw. eine Prävention von Infektionskrankheiten erzielt werden (THOMPSON et al. 1998).

Zahlreiche Spezies weisen eine erhebliche genetische Diversität auf, die man sich zu Nutze machen kann, um in Krankheitsausbrüche involvierte Stämme zu typisieren. Einerseits können mit Hilfe der PCR definierte Parasiten-Gensequenzen in geringsten Mengen nachgewiesen werden, und andererseits kann durch Sequenzierung eine größtmögliche Spezifität erreicht werden. Auf diese Weise können alle drei Glieder einer Infektionskette, der Erreger, der Vektor und der Wirt (wenn vorhanden) genau identifiziert werden und das Zustandekommen von Epidemien aufgeklärt und Infektionskrankheiten überwacht werden (TIBAYRENC 1998). Beispielsweise konnte bei dem Kryptosporidiose-Ausbruch von Milwaukee, von dem 400.000 Menschen betroffen waren, durch molekular-epidemiologische Untersuchungen abgeklärt werden, dass alle involvierten Personen mit dem gleichen *Cryptosporidium*-Stamm infiziert waren und dass dieser Stamm durch anthropogene Verunreinigung in das Trinkwasser gelangt war (THOMPSON et al. 1998).

Eine weitere Fragestellung ist der Zusammenhang zwischen genetischer Variabilität und biologischer Diversität. Beispielsweise ist nach wie vor ungeklärt, ob es sich bei *Trypanosoma brucei gambiense*, dem Erreger der Schlafkrankheit in West-Afrika, *T. brucei rhodesiense*, dem Erreger der Schlafkrankheit in Ost-Afrika, und *T. brucei brucei*, dem Erreger der Rinder-Trypanosomose, um tatsächliche phylogenetische Einheiten handelt. Für die Gruppe der Nematoden konnte durch einen Vergleich der 18S rDNA gezeigt werden, dass der Parasitismus innerhalb dieses Taxons zumindest viermal unabhängig voneinander entstanden ist (BLAXTER et al. 1998).

5.3 Therapie und Prophylaxe

Die Entwicklung neuer, schneller DNA-Sequenzierungstechnologien liefert ungeheure Quantitäten genomischer Rohinformation – von der Analyse exprimierter Gene bis hin zur Sequenzierung vollständiger Genome. So können neue, wesentliche Unterschiede zwischen den Parasiten und ihren Wirten aufgedeckt werden, welche möglicherweise für die Entwicklung zukünftiger Therapeutika und Impfstoffe von Nutzen sein können.

5.3.1 Entwicklung antiparasitärer Wirkstoffe

Die Entwicklung neuer antiparasitärer Wirkstoffe ist von ausgesprochen großer Bedeutung, da bei vielen Parasiten, vor allem in den Genera *Plasmodium* und *Trypanosoma*, aber beispielsweise auch bei *Trichomonas* zunehmend Resistenzen auftreten. Durch automatisierte Screening-Verfahren können einerseits potentielle Wirkstoff-Kandidaten rasch untersucht werden – durch Screening-Methoden mit hohem Durchlauf können ganze Wirkstoff-Bibliotheken durchgetestet werden. Andererseits eröffnen sich durch die Fülle an Sequenzinformation vollkommen neue Wege in der Wirkstoffentwicklung. Beispielsweise können durch die sogenannte Knock-out-Technik bestimmte Gene des jeweiligen Parasiten ausgeschaltet werden und dadurch die Funktion des kodierten Proteins ermittelt werden. Es lässt sich zeigen, welche Gene für das Überleben des Parasiten essentiell sind, und mit diesem Wissen können gezielt neue Wirkstoffe entwickelt werden (GUTIERREZ 2000). Bei der Entwicklung sogenannter „Designer-Substanzen" wird ein Zielmolekül identifiziert, durch Kristallographie die dreidimensionale Struktur aufgeklärt, und dann werden spezifische Inhibitoren entwickelt, die gegen das aktive Zentrum des Zielmoleküls gerichtet sind (BARRETT et al. 2000).

An dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* konnten durch Expression bestimmter Gene bereits zahlreiche Wirkstoff-Kandidaten zur Behandlung von Nematoden-Infektionen ermittelt werden (HASHMI et al. 2001). Bei Leishmanien konnte ein neuer, wenn auch toxischer Inhibitor, das Flavopiridol entdeckt werden. Diese Substanz führt bei *Leishmania* zu einer Unterbrechung des Zell-Zyklus (MCKEAN et al. 1999). In der Regel wird nach einem biochemischen Ablauf oder einem Enzym gesucht, das nur bei dem Parasiten nicht aber beim Menschen vorkommt. So konnte Trypanothion in *Trypanosoma brucei*, oder der Shikimat-Weg, der für die Gruppe der Apicomplexa, zu der zahlreiche wichtige Parasiten, wie *Plasmodium* oder *Toxoplasma* gehören, charakteristisch ist, entdeckt werden (GUTIERREZ 2000; GULL 2002; ROBERTS et al. 2002).

5.3.2 Entwicklung von Vakzinen

Die zunehmende Information, die durch die bereits laufenden und geplanten Genomprojekte zur Verfügung steht, lässt auch in der Entwicklung von anti-parasitären Vakzinen auf Erfolge hoffen. Die Technik der genetischen Immunisierung erlaubt ein einfaches und rasches Austesten potentieller Vakzin-Kandidaten. Durch die „Microarray"-Technik und computerunterstützte Auswertungen

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

kann in kürzester Zeit eine unglaubliche Anzahl an Zielmolekülen durchgetestet werden und außerdem vorausgesagt werden, welche Genprodukte zum richtigen Zeitpunkt am richtigen Ort und somit als immunologische Angriffsmoleküle geeignet sind. Weiters ist die Immunisierung mit nackter DNA eine neue und sehr vielversprechende Methode in der Prävention und der Behandlung von Infektionskrankheiten (BARRETT et al. 2000).

Durch die Explosion an Information erwartet man in den nächsten Jahren eine ganze Reihe neuer Vakzin-Kandidaten in der Parasitologie (MCKEAN et al. 1999). Eine Erreger-Gruppe, bei der man tatsächlich optimistisch ist, in den nächsten Jahren in der Impfstoffentwicklung voranzukommen, sind die Leishmanien. Beispielsweise wird das erste rekombinante Antigen, das als Impfstoff gegen Leishmaniose eingesetzt wurde, das Leishmaniolysin oder gp63, noch immer als vielversprechender Kandidat gehandelt (HANDMAN 2001). Die erste kommerziell erwerbliche rekombinante Anti-Parasiten-Vakzine war interessanterweise ein Impfstoff gegen einen Ektoparasiten, nämlich gegen *Boophilus microplus*, eine Zecken-Art, die an Rindern parasitiert. Boophilide haben nicht zuletzt als Überträger des durch Babesien hervorgerufenen Texasfieber veterinärmedizinische Bedeutung und die effektivste Weise von Vektoren übertragene Krankheiten in den Griff zu bekommen, ist jene, die Vektoren zu bekämpfen (WILLADSEN 2001).

5.4 Phylogenie

Das Hauptanwendungsgebiet molekularbiologischer Methoden in der Parasitologie ist sicherlich die Phylogenie. Die moderne Phylogenetik wäre ohne die Anwendung molekularbiologischer Techniken kaum denkbar, denn dadurch, dass man nun anstatt der nur subjektiv bewertbaren morphologischen Merkmale, die Gene der Organismen vergleichen kann, können auch Organismen berücksichtigt werden, welche wegen ihrer geringen Größe oder ihrer wenig charakteristischen Morphologie schwer zu klassifizieren waren. Gerade für die Untersuchung der Phylogenie vieler Parasiten ist daher die Molekularbiologie von größter Bedeutung, da einerseits zahlreiche Parasiten, wie etwa die meisten Protozoen, nur wenige tatsächlich spezifische morphologische Merkmale aufweisen und da, andererseits gerade Parasiten oftmals in Anpassung an ihre parasitäre Lebensweise eine sehr abgewandelte oder reduzierte Morphologie und Physiologie aufweisen. Allerdings muss festgehalten werden, dass ein „Gen-Stammbaum", gleichgültig welches Gen man untersucht, die tatsächlichen phylogenetischen Beziehungen immer nur zum Teil widerspiegeln kann.

Immerchin konnte durch molekularbiologische Techniken gezeigt werden, dass viele sehr einfach erscheinende Organismen nicht tatsächlich ursprünglich sind, sondern in Anpassung an den jeweiligen Lebensraum sekundäre Reduktionen aufweisen. Dies gilt zum Beispiel für die Mikrosporidien, für die Amöben, aber auch für die gesamte Gruppe der Kinetoplastida, zu denen so wichtige Parasiten, wie die Trypanosomen und Leishmanien gehören (siehe Beitrag „Phylogenie").

6 Zusammenfassung

Die Werkzeuge der Molekularbiologie gewinnen auch für die Parasitologie immer mehr an Bedeutung. Die zahlreichen Genom-Projekte, sowohl in der Protozoologie, als auch in der Helminthologie erlauben große Fortschritte im Studium der Biologie von Parasiten und in der Verbesserung der Diagnostik, der Behandlung und der Prophylaxe vieler Parasitosen.

Molekularbiologische Methoden haben in der Parasitologie ihre Hauptanwendungsgebiete sicherlich in epidemiologischen und in phylogenetischen Studien. Dennoch sind diese Methoden beispielsweise bei morphologisch nicht unterscheidbaren Spezies unterschiedlicher Pathogenität auch in der Diagnostik von unschätzbarem Wert. Bestimmte DNA-Sequenzen ermöglichen einen hohen Grad an Spezifität, und die PCR erlaubt einen ausgesprochen hohen Grad an Sensitivität. Neue Techniken, wie zum Beispiel die "DNA-microarrays", lassen schnellste Screening-Tests zu, und die Möglichkeit, Genom-Daten zu nutzen, erhöht die Optionen in der Prophylaxe und Therapie von Parasitosen. Dennoch muss festgehalten werden, dass die weitaus meisten dieser Techniken sehr laborintensiv und außerdem durchwegs teuer sind und deshalb, und zwar gerade in jenen Ländern, in denen die wichtigsten Parasitosen tatsächlich endemisch sind, oft nicht einsetzbar sind.

Schlüsselwörter: **Molekularbiologie, DNA, PCR, Sequenzieren, Diagnostik, Phylogenie.**

7 Anhang

7.1 Zitierte Literatur

BARRETT J., JEFFERIES J.R. & P.M. BROPHY (2000): Parasite proteomics. — Parasitol. Today **16**: 400-403.

BLAXTER M., ASLETT M., GUILIANO D. & J. DAUB (1999): Parasitic

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

helminth genomics. Filarial Genome Project. — Parasitology **118** Suppl: S39-51.

BLAXTER M.L., DE LEY P., GAREY J.R., LIU L.X., SCHELDEMAN P., VIERSTRAETE A., VANFLETEREN J.R., MACKEY L.Y., DORRIS M., FRISSE L.M., VIDA J.T. & W.K. THOMAS (1998): A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. — Nature **392**(6671): 71-75.

DEGRAVE W.M., MELVILLE S., IVENS A. & M. ASLETT (2001): Parasite genome initiatives. — Int. J. Parasitol. **31**:532-536.

FISH S.A., SHEPHERD T.J., MCGENITY T.J. & W.D. GRANT (2002): Recovery of 16S ribosomal RNA gene fragments from ancient halite. — Nature **417**: 432-6.

GASSER R.B. (1998): What's in that band? — Int. J. Parasitol. **28**: 989-996.

GULL K. (2002): The cell biology of parasitism in *Trypanosoma brucei*: insights and drug targets from genomic approaches? — Curr. Pharm. Des. **8**: 241-256.

GUTIERREZ J.A. (2000): Genomics: from novel genes to new therapeutics in parasitology. — Int. J. Parasitol. **30**: 247-252.

HANDMAN E. (2001): Leishmaniasis: current status of vaccine development. — Clin. Microbiol. Rev. **14**: 229-243.

HASHMI S., TAWE W. & S. LUSTIGMAN (2001): *Caenorhabditis elegans* and the study of gene function in parasites. — Trends Parasitol. **17**: 387-393.

KNIGHT J. (2002): All genomes great and small. — Nature **417**(6887): 374-376.

MCKEAN P.G., KEEN J.K., KELLY J.M. & D.F. SMITH (1999): Molecular parasitology: new insights. — Parasitol. Today **15**: 469-470.

MCKEAND J.B. (1998): Molecular diagnosis of parasitic nematodes. — Parasitology **117** Suppl: S87-96.

MORANGE M. (1998): A History of Molecular Biology. — Harvard University Press. Boston: 1-336.

MORGAN U.M. & R.C. THOMPSON (1998): Molecular detection of parasitic protozoa. — Parasitology **117** Suppl: S73-85.

ROBERTS C.W., ROBERTS F., LYONS R.E., KIRISITS M.J., MUI E.J., FINNERTY J., JOHNSON J.J., FERGUSON D.J., COGGINS J.R., KRELL T., COOMBS G.H., MILHOUS W.K., KYLE D.E., TZIPORI S., BARNWELL J., DAME J.B., CARLTON J. & R. MCLEOD (2002): The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. — J. Infect. Dis. **185** Suppl 1: S25-36.

SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A. & N. ARNHEIM (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. — Science **230**(4732): 1350-1354.

SANGER F., NICKLEN S. & A.R. COULSON (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. — Proc. Natl. Acad. Sci. **74**: 5463-5467.

SIBLEY D. & K. HALDAR (1999): Molecular parasitology goes cellular. — Cell. Microbiol. **1**: 259-262.

SINGH B. (1997): Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. — Int. J. Parasitol. **27**: 1135-1145.

SUMMERS W.C. (2001): History of Molecular Biology. — In: Encyclopedia of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltd., Nature Publishing Group, www.els.net.

TARLETON R.L. & J. KISSINGER (2001): Parasite genomics: current status and future prospects. — Curr. Opin. Immunol. **13**: 395-402.

THOMPSON R.C., CONSTANTINE C.C. & U.M. MORGAN (1998): Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology? — Parasitology **117** Suppl: S161-S175.

TIBAYRENC M. (1998): Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. — Int. J. Parasitol. **28**: 85-104.

WATSON J. D. & F. H. C. CRICK (1953): Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. — Nature **171**: 737.

WEISS J.B. (1995): DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. — Clin. Microbiol. Rev. **8**: 113-130.

WILLADSEN P. (2001): The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. — Vet. Parasitol. **101**: 353-368.

WILLIAMS D.W., WILSON M.J. & M.A. LEWIS (1999): Deoxyribonucleic acid typing methods for medically important microorganisms. — Br. J. Biomed. Sci. **56**: 56-65.

7.2 Weiterführende Literatur

ALPHEY L. (1998): DNA- Sequenzierung. — Spektrum Akad. Verlag: 1-242.

BOOTHROYD J.C. & R. KOMUNIECKI (1995): Molecular Approaches to Parasitology. — Wiley-Liss: 1-560.

BROWN T.A. (1996): Gentechnologie für Einsteiger. 2. Auflage. — Spektrum Akad. Verlag: 1-367.

HENNIG W. (1995): Genetik. — Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 1-776.

IBELGAUFTS H. (1990): Gentechnologie von A-Z. Erweiterte Ausgabe. — VCH VerlagsGes., Weinheim: 1-658.

MARR J.J. & M. MULLER (1995): Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. 1st edition. — Academic Press: 1-349.

MÜLLER H.-J. (2001): PCR-Polymerase-Kettenreaktion. — Spektrum Akad. Verlag: 1-220.

PÜHLER A. (Ed.; 2000): Römpp kompakt Lexikon Biochemie und Molekularbiologie. — Thieme, Stuttgart: 1-725.

SURZYCKI S. (2000): Basic Techniques in Molecular Biology (Springer Lab Manuals). — Springer Verlag: 1-434.

Anschrift der Verfasser:

Mag. Dr. Julia WALOCHNIK
Univ.-Prof. Dr. Horst ASPÖCK
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene
und Medizinische Mikrobiologie der Universität
Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien
Austria
E-mail: julia.walochnik@univie.ac.at